

(11) 【公表番号】 特表2002-511897 (P2002-511897A)

(43) 【公表日】 平成14年4月16日 (2002. 4. 16)

(54) 【発明の名称】 生体吸収性の抗癒着カルボキシポリサッカライド/ポリエーテル高分子間複合体及び外科手術の癒着軽減におけるそれらの使用方法

(51) 【国際特許分類第7版】

C08J 5/18

A61L 31/00

C08L 1/32

3/00

5/00

71/08

//C08L 1:08

(21) 【出願番号】 特願平11-504437

(86)(22) 【出願日】 平成10年5月28日 (1998. 5. 28)

(86) 【国際出願番号】 PCT/US98/10814

(87) 【国際公開番号】 WO98/58011

(87) 【国際公開日】 平成10年12月23日 (1998. 12. 23)

(31) 【優先権主張番号】 08/877, 649

(32) 【優先日】 平成9年6月17日 (1997. 6. 17)

(71) 【出願人】

【氏名又は名称】 フジオメッド インコーポレイテッド

【住所又は居所】 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 93401 サン ルイス オビスポ
グラナダ ドライヴ 170-エイ

(72) 【発明者】

【氏名】 シュウォルツ ハーバート イー

(74) 【代理人】 中村 稔 (外9名)

(57) 【要約】

本発明は、カルボキシ含有ポリサッカライドとポリエーテルの高分子間複合体から作られる、生体付着性、生体吸収性、抗癒着性の組成物の改良された製造方法及び使用方法並びにその生成する組成物に関する。そのポリマーは相互に会合され、乾燥され或いは液体として使用される。生体吸収性、生体付着性、抗癒着性の組成物は、外科手術後の癒着の形成を防止するための手術に有用である。その組成物は、生体内で分解するように設計され、体から除去される。膜は、乾燥して或いは任意に水溶液中で調整された後、手術時に挿入される。このような膜の抗癒着性、生体付着性、生体吸収性、抗血栓形成性及び物理的性質は、ポリマーの製造溶液の pH、ポリサッカライドの組成、ポリエーテルの組成を厳密に調節することによって、又は手術に使用する前に膜を調整することによって、要求

通りに変えることができる。2層又は多層膜を製造でき、用いて抗癌着膜の物理的性質及び生物学的性質をさらに制御することができる。また、抗癌着膜は、薬剤を手術部位に送達してそれらを局所に放出することができる。

【特許請求の範囲】

1. カルボキシポリサッカライド (CPS) と、任意的なポリエーテル (PE) との会合複合体を含んでなる膜であって、生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つである膜。
2. 上記 CPS が、カルボキシメチルセルロース(CMC)、カルボキシエチルセルロース、キチン、ヒアルロン酸、デンプン、グリコーゲン、アルギン酸塩、カルボキシメチルキトサン、ペクチン、カルボキシメチルデキストラン、並びにヘパリン、ヘパリン硫酸、及びコンドロイチン硫酸のようなグリコサミノグリカンから成る群より選択される、請求の範囲第1項に記載の膜。
3. 上記 CPS の分子量が100kd～10,000kdである、請求の範囲第1項に記載の膜。
4. 上記 CPS が CMC であり、かつ該 CMC の分子量が600kd～5000kdである、請求の範囲第1項に記載の膜。
5. 上記 CMC の分子量が約700kdである、請求の範囲第4項に記載の膜。
6. PE がポリエチレンオキシド (PEO) であり、かつ該 PEO の分子量が5kd～8000kdである、請求の範囲第1項に記載の膜。
7. CPS の比率が、質量で10%～100%であり、PE の含量が質量で0%～90%である、請求の範囲第1項に記載の膜。
8. CPS の置換度が、約0より大きく、約3以下の範囲を包含する、請求の範囲第1項に記載の膜。
9. 生体付着性である、請求の範囲第1項に記載の膜であって、かつ (i)CPS と PE との会合度、(ii)CPS と PE の分子量、(iii)CPS の置換度、(iv)CPS と PE の比率、及び (v)膜の pH の少なくとも1つを変化させることによって、膜の生体付着が調節されている膜。
10. さらに CPS 及び PE の膜の多層を包含する、請求の範囲第1項に記載の膜。
11. さらに薬剤を包含する、請求の範囲第1項に記載の膜。
12. 上記薬剤が、抗生物質、抗炎症剤、ホルモン、走化因子、鎮痛薬、及び麻酔薬から成る群より選択される、請求の範囲第11項に記載の膜。
13. CPS と PE の希薄溶液から膜を製造する方法であって、上記 CPS の溶液及び上記 PE の溶液が一緒に混合され、乾燥され、かつ該膜が、生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つである膜の製造方法。
14. 膜が、CPS 及び PE の多層として製造される、請求の範囲第13項に記載の方法。
15. さらに薬剤を包含する、請求の範囲第13項に記載の方法。
16. 乾燥された膜を、移植のために希薄溶液に浸漬して該膜の pH を変えることによって調整する方法。

17. 以下の工程：外科的切開を行う工程、CPS 及び PE から作られた、生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つである膜を外科的切開口に供給する工程、該膜を組織に施す工程、該膜を水和させ、組織に付着させ、又は水和及び組織への付着の両方をさせる工程、及び該切開口を封鎖する工程を包含する手術の際及び手術の後の癒着形成を防止する方法。

18. ヒドロゲルを手術の際に供給する方法であって、該ヒドロゲルが、生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つであり、かつ以下の工程：外科的切開を行う工程；

CPS 及び任意的な PE から作られた、生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つである膜を外科的切開口に供給する工程；

該膜を組織に施す工程；

該膜を水和させ、組織に付着させ、又は水和及び組織への付着の両方をさせる工程；及び該切開口を封鎖する工程；

を包含する方法。

19. 以下の工程：CPS と PE との酸性溶液であって、CPS と PE とが会合複合体を形成する溶液を作る工程；

該溶液を乾燥させて該複合体の乾燥形態を形成する工程；

塩基性溶液を添加することによって、該乾燥複合体の pH を高める工程；

を包含する、CPS と PE との会合複合体を調製する方法。

20. カルボキシポリサッカライド (CPS) 及び任意的なポリエーテル (PE) の会合複合体を含んでなる酸性ヒドロゲルであって、調節された度合の生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つを有する酸性化ヒドロゲル。

21. 上記 CPS が、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、キチン、ヒアルロン酸、デンプン、グリコーゲン、アルギン酸塩、カルボキシメチルキトサン、ペクチン、カルボキシメチルデキストラン、並びにヘパリン、ヘパリン硫酸、及びコンドロイチン硫酸のようなグリコサミノグリカンから成る群より選択される、請求の範囲第20項に記載のヒドロゲル。

22. さらに薬剤を包含する、請求の範囲第20項に記載のヒドロゲル。

23. 上記薬剤が、抗生物質、抗炎症剤、ホルモン、走化因子、鎮痛薬、及び麻酔薬から成る群より選択される、請求の範囲第22項に記載のヒドロゲル。

24. カルボキシポリサッカライド (CPS) 及び任意的なポリエーテル (PE) の会合複合体を含んでなる膜であって、調節された度合の生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つを有する膜。

25. カルボキシポリサッカライド (CPS) 及び任意的なポリエーテル (PE) の会合複合体を含んでなるヒドロゲルであって、調節された度合の生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癌着性の少なくとも1つを有するヒドロゲル。

26. 外科手術部位に移植して癒着を防止するための膜の調製方法であって、以下の工程：
7未満のpHを有する溶液を作る工程；

該溶液を少なくとも部分的に乾燥させて、該膜の酸性前駆体を形成する工程；及び7以上のpHで、該外科手術部位における該膜前駆体の滞留時間を増すように選択して、該膜前駆体のpHを約7以上に高めて、該膜の生体適合性を高める工程；を包含する方法。

27. 以下の工程：約100kdと約10,000kdの範囲の分子量を有するCPSを選択する工程；約0より大きく3以下の範囲の置換度を有するCPSを選択する工程；

約5kdと約8000kdの範囲の分子量を有するPEを選択する工程；

CPSの比率が質量で約10%～約100%であり、PEの含量が質量で約0%～90%の範囲である、CPSとPEとの比率を選択する工程；

約1.0と約7.0の間の膜のpHを選択する工程；

の少なくとも1つに従って作られる、請求の範囲第1項に記載の膜。

28. カルボキシポリサッカライド (CPS) 及び任意的なポリエーテル (PE) の会合複合体を含んでなる調整された膜であって、以下の工程：前記CPSの溶液を得る工程、前記PEの溶液を得る工程、CPS及びPEの溶液を一緒に混合して混合物を形成する工程、該混合物のpHを約1.0以上に調整する工程、該混合物を乾燥させる工程、前記膜を、該膜のpHより高いpHの溶液に浸漬することによって調整する工程、及び該調整膜を乾燥する工程によって製造され、かつ該膜が、生体吸収性、生体付着性、抗血栓形成性、及び抗癒着性の少なくとも1つである膜。

【発明の詳細な説明】

生体吸収性の抗癒着カルボキシポリサッカライド/ポリエーテル高分子間複合体及び外科手術の癒着軽減におけるそれらの使用方法発明の分野 本発明は、一般的に、カルボキシポリサッカライド/ポリエーテル高分子間複合体を含んでなる膜の製造、及び、手術後の組織間の癒着形成を阻止するための当該膜の使用に関する。膜の特性は、所望の癒着の癒着防止、生体吸収、生体付着、及び抗血栓形成効果を達成するように合わせることができ。

発明の背景 癒着は、隣接する体組織の間又は組織と内臓との間に生じる望ましくない組織の成長である。癒着は、一般に、外科的手術の後癒着する間に形成し、癒着が存在すると、それらに隣接する構造の組織や臓器の正常な動作を妨害する。

医療及び科学界では、高分子量のカルボキシ含有生体高分子を用いて手術後の癒着の形成を軽減する方法が研究してきた。これらの生体高分子は、治癒する間、物理的なバリアとして働き組織を相互に引き離す水和ゲルを形成できるので、正常な隣接構造の間に癒着はできない。実質的に完治すると、バリアはもはや必要でなく、体から除去され、患部組織の正常な機能を可能にするべきである。

この目的のため、数種の生体高分子が使用されてきた。例えば、Balazsらの米国特許第

4,141,973号は、癒着防止のためのヒアルロン酸 (HA) の使用について開示している。

また、メチルセルロース及びメチルセルロース誘導体も、手術後発生しうる癒着及び癒着の形成を減じることと知られている。(Thomas E.Elkinsら、Adhesion Prevention by Solutions of Sodium Carboxymethylcellulose in the Rat,Part I,Fertility and Sterility,Vol.41,No.6,June 1984;Thomas E.Elkins,M.D.ら、Adhesion Prevention by Solutions of Sodium Carboxymethylcellulose in the Rat,Part II,Fertility and Sterility,Vol.41,No.6,June 1984)

また、カルボキシ含有生体高分子溶液に加え、ポリエーテル溶液も術後の癒着発生を減少させることができる。Pennellらの米国特許第 4,993,585号は、術後の癒着形成を軽減するために15%までの溶液でポリエチレンオキドを使用することについて記載している。

Pennellらの米国特許第 5,166,839号は、約2.5質量%までのカルボキシメチルセルロースと、濃度が約0.5質量%までのポリエチレンオキドとの混合物で、生理的に許容されるpHの中性混合物の使用について記載している。

Smithらの米国特許第 3,387,061号は、pHを3.5以下、好ましくは3.0以下に低くして、生じた沈殿を乾燥、焼成することで製造されるカルボキシメチルセルロースとポリエチレンオキドとの不溶性会合複合体について記載している。これらの膜は癒着軽減のための手術用途については設計されなかった。このような膜は、あまりに不溶性、剛性であり、術後の癒着防止に理想的な嚢嚢をほとんどしない。さらに、それらの過剰な残度は組織障害を引き起こすだろう。

このように、本発明にはいくつかの目的がある。

第1の目的は、手術中及び手術後の癒着形成の発生を減じる組成物及び方法を提供することである。これは、最初の又は2回目の手術における新生の癒着形成の防止を包含する。

また、本発明の他の目的は、1回目の処置後に形成した新生の癒着の除去を意図した2回目の処置後の癒着再形成を防止することである。

本発明の概要 本発明の一観点は、カルボキシポリサッカライド (CPS) 及び任意的なポリエーテル (PE) の高分子間会合で作られ、手術後の癒着の阻止に有用な組成物である。

本発明の他の観点は、所望の物理的性質及び生物学的性質を示すCPSとPEとの複合体の製造方法を包含する。

所望の物理的性質を有する複合体の作製は、ポリマー間の結合度を変化させることにより達成される。この性質の変化は、鋳造溶液(casting solution)のpH(以後、“膜のpH”という)、ポリマーの分子量、ポリマー混合物の百分率組成、及び/又はCPS内のカルボキシル残基による置換度(d.s.)を変換することによって達成される。膜の性質の付加的な変化は、膜の最初の製造後に膜を調整することによって達成される。また、種々の層を選択して種々の性質を示す多層膜も、本発明の一観点である。

さらに、本発明のいくつかの観点に従い、当該膜に薬剤を含むことができ、薬理学的化合物を直接組織に供給することができる。

材料は生体適合性であり、所望の期間内に体から取り除かれ、その期間を制御することができ、膜を使用して、手術後の癒着の形成を阻止する。

先行技術と異なり、抗癒着組成物は所望の性質を有して製造できる。さらに、製造後に抗癒着膜(anti-adhesion membranes)を調整することにより、本発明の用途に有利な手術後の癒着を軽減するという、予想外の特性が生じた。

図面の簡単な説明ズ1種々の pH において水素結合により生成する、カルボキシポリサッカライドとポリエーテルとの会合複合体の形成理論を示す略図である。

ズ2 CMC 及びポリエチレンオキシド(PEO)含有の膜を製造する(casting)ために作られた溶液の pH 滴定の研究結果を示す。

ズ3 室温で種々の pH、2.0~4.31 で製造溶液から作られた CMC/PEO 膜の水和又は膨潤の時間経過を示す。

ズ4 室温で pH7.4 のリン酸緩衝食塩水(PBS)溶液中における CMC/PEO 膜の水和又は膨潤の時間経過を示す。

ズ5 の組成及び pH の膜についての PBS 中での溶解度を示す。

ズ6 CMC/PEO 膜による PBS 溶液の酸性化についての研究結果を示す。

ズ7 CMC/PEO 膜の水和又は膨潤に対する PEO の分子重量変化の効果を示す。

好ましい実施態様の詳細な説明 定義 発明を詳細に説明する前に、本明細書で使用する以下の用語を定義する。

用語“癒着”(adhesion)は、手術の外傷のような炎症性の刺激の後に形成する組織と臓器間の異常な付着を意味する。用語“癒着防止”(adhesion prevention)及び“抗癒着”(anti-adhesion)は、手術後の癒着の形成及び傷ついた組織間の線維帯及び傷ついた組織と傷つかない組織間の線維帯の形成を防止又は阻止することを意味する。

用語“会合複合体”又は“高分子間複合体”は、CPS 及び/又は PE を含むポリマー間に形成される分子の細目構造を意味する。

用語“生体付着性”は、生きた組織に付着する能力を意味する。

用語“生体吸収性”は、吸収されて体から除去される能力を意味する。

用語“生体適合性”は、生きた組織及び器官に対して生理学的に許容されることを意味する。

用語“カルボキシメチルセルロース”(“CMC”)は、セロビオース単位の繰り返しから構成され、さらに2個のアンヒドログルコース単位(B-グルコピラノース残基)から構成され、1、4 グルコシド結合によって結合されているポリマーを意味する。

用語“置換度”(“d.s.”)は、1 モルのセロビオースに存在するカルボキシル残基の数の平均を意味する。

用語“椎間板切除術”は、破壊した椎骨板を除去する外科的手術を意味する。

用語“内視鏡”は、腹腔鏡又は関節鏡のような、体内の組織を密接観察するための光ファイバーデバイスを意味する。

用語“線維組織”は、癒着又は癒着を意味する。

用語“ヒアロン酸”(“HA”)は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸とのジサッカライド単位の繰り返しから構成されるアニオン性ポリサッカライドを意味する。HA は、結合組織の細胞外マトリックスの天然成分である。

用語“水和”(また“膨潤”)は、ポリマー溶液によって溶媒を取り込むプロセスを意味する。

用語“水和率”(また“膨潤率”)は、水和した膜のウェット質量からドライ質量を減じ、ドライ質量で除し、100 倍した%を意味する。

用語“ヒドロゲル”は、多量の水が存在する、親水性ポリマーの三次元網目構造を意味する。

用語“椎弓切除術”は、1 以上の椎骨薄板を除去する外科的手術を意味する。

用語“腹腔鏡”は、腹部の創制を通して挿入される小径の鏡を意味し、最小限の侵襲性の外科的手術法で可視化のために使用される。

用語“膜の pH”は、膜を作る製造溶液の pH を意味する。

用語“中皮”は、胸膜腔、心膜腔及び腹膜腔を内張りする上皮を意味する。

用語“腹膜”は、腹腔を内張りし、内臓を囲む漿液膜を意味する。

用語“ポリエチレンオキシド”は、エチレンオキシドモノマーから構成される非イオン性ポリエーテルポリマーを意味する。

用語“組織虚血”は、生きた組織への血流の欠乏を意味する。

本発明の詳細な説明 本発明は、移植可能な、生体吸収性の、カルボキシポリサッカライド(CPS)

とポリエーテル(PE)との会合複合体を供給する工程を含む、外科的手術の際及び術後の癒着の形成を軽減する方法に関する。複合体は、一般的に、適切な量及び組成の CPS と PE とを溶液中で混合し、任意に、その溶液を所望の pH に酸性化して酸性化会合複合体を形成し、所望により、その溶液を適切な平らな面に注ぎ、混合物を乾燥させて減圧(>0.01Torr) 又は大気圧(760Torr) で、膜を形成することによって製造される。その会合複合体は、創傷を治療する際に癒着を形成するであろう組織間に配置される。その複合体は、その組成、製造方法、及び製造後の調整に依存して異なる期間、その部位に留まる。組織が実質的に治癒すると、その複合体は分解及び/又は溶解して体から取り除かれる。

本発明の膜は、所望の剛度、種々の生体吸収性速度、種々の生体付着度、種々程度の抗癒着効果及び種々程度の抗血栓形成性を有して製造できる。会合複合体形成の正確な機構は、完全には解らないが、ポリサッカライドのカルボキシル残基と、ポリエーテルのエーテル酸素原子との間に水素結合が生じることが一つの理論である。Dieckmanら、Industrial and Engineering Chemistry 45(10): 2287-2290 (1953) を参照されたい。ズ1はの理論を図示している。膜が製造されるポリマー溶液(“製造溶液”)の pH は、適切な酸を利用して慎重に滴定して酸性の pH にする。最初の中

性のアニオン性ポリサッカライドのカルボキシル基は、混合ポリマー製造溶液に酸を添加

することによって、プロトン化されてカルボン酸基が遊離する。そのプロトン化されたカルボキシル残基は、実質的にポリエーテルのエステル酸基原子と静電的に結合でき、双極子-双極子相互作用タイプの水素結合を形成できる。

鑄造溶液の pH を減少させると、プロトン化されるカルボキシル残基の数が増え、ポリエーテルと水素結合できる数が増える。このためポリマーの網目構造が高まり、その結果、より強く、より硬く、溶解性の低い、かつ生体吸収性の低い膜が生成する。他方、鑄造溶液を中性の pH に近づけると、カルボキシポリサッカライドのカルボキシル基は、より負の電荷を帯びて、相互に反発し、かつ PE のエーテル酸基原子と反発して、その結果、ほとんど或いは全く構造的に結合性のない弱い結合のゲルを生じる。

説明の目的のため、このような相互作用は、ずれるように、3つの場合に分類することができ。図は、可能な分子間複合体生成の概略を示し、1個のカルボキシポリサッカライド (CPS) 鎖から4個のカルボキシメチル基が、1個のポリエーテル (PE) 鎖の4個の各エーテル酸基に対抗して配列される。図 1a は、pH が約7の場合の状態を示す。中性の pH では、カルボキシル残基は解離され、PE のエーテル酸基と負に荷電された CPS のカルボキシメチル基との間には水素結合複合体が形成されない。図 1b は、pH が約2の場合の状態を示す。低 pH では、大部分のカルボキシル残基がプロトン化され、大部分が PE のエーテル酸基原子と水素結合される。図 1c は、pH がおよそ3-5の場合の状態を示す。約4.4の CPS の pKa では、カルボキシル基の半分がプロトン化され、PE の対応するエーテル酸基原子と水素結合される。この中間的な pH 領域内で、本発明に従い、架橋の程度を厳密に調整できる(図2)。

図 1b に従って作られる膜は、Smith ら (1968) によって記載された膜と似ている。それらは、理想的な癒着予防膜のいくつかの主要な特徴を欠いている。低 pH 膜は、水和に乏しい。また、それらは感度が粗く、成形し難く、かつ溶解し難い。それらは溶解しないので、短期間では十分に体から除去されない。さらに、鑄造溶液の酸性度が高いため、より中性の pH の膜に比し、組織にかなり多量の酸を運ぶ。組織障害が生じる前に、この酸負荷を中性化するのには生理的機構は困難を伴う。従って、それらは生体適合性に乏しい。

その先行技術と対照的に、上述した本発明の膜は、図 1c で概略を示したように、癒着予防膜を与える。これらの膜は、中間的な pH の範囲、典型的にはおよそ3と5の間で製造されるので、架橋の量が多すぎて十分に早くは溶解しないような複合体を生じること、架橋が少なすぎて、あまりに早く分解してしまうような複合体が生じることもない。さらに、鑄造溶液の pH を変化させると、溶液のレオロジー特性が変わり(表1)、それら溶液から作られる膜の物理的性質が変わる(表2)。

会合複合体の形成についての上述の機構は、本発明には必要ない。CPS 及び PE についての我々の研究結果は、構成成分間の会合についての如何なる特定の理論に頼ることなく、本発明を十分に述べている。

CPS/PE 鑄造溶液から膜を製造するときは、CPS 及び PE の溶液が容易に取扱えるというこののみを必要とする。CPS の希釈溶液(約 10%質量/体積までは、取扱い易く、約 2% CPS の溶液はさらに扱い易い。約 20% (質量/体積) までの PEO は、作り易く、扱い易く、また約 1 質量%の溶液は扱い易い。

カルボキシポリサッカライドは、いずれの生体適合性の種類でもよく、限定されるわけではないが、カルボキシメチルセルロース(CMC)、カルボキシエチルセルロース、キチン、ヒアルロン酸、デンプン、グリコーゲン、アルギン酸塩、ペクチン、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルキトサン、並びにヘパリン、ヘパリン硫酸、及びコンドロイチン硫酸のようなグリコサミノグリカンを含む。好ましくは、カルボキシメチルセルロース又はカルボキシエチルセルロースが使用される。さらに好ましくは、カルボキシメチルセルロース (CMC) が使用される。カルボキシポリサッカライドの分子量は、100kd~10,000kd に変えることができる。600kd~1000kd の範囲の CPS はよく作用し、700kd の CPS はよく作用し、かつ市販品を入手し易い。

同様に、使用するポリエーテルは重要でない。本発明の好ましいポリエーテルはポリエチレンオキシド (PEO) である。CMC ナトリウムはそれ自体抗癒着バリアとしてゲル形態で用いられていたが、CMC/PEO 膜は、癒着防止に有用ないくつかの特異的性質を有する。

CMC と PEO から作られる膜は、CMC のみで作られる硬く剛性の膜より柔軟である。従って、手術の際、膜を操作して、種々の組織に癒着させるのに必要な形にびったり合わせることができる。さらに、複合体に PEO を含めると、血液タンパク及び血小板の膜への付着を減少させて癒着防止を助ける抗血栓形成特性を与える(Amiji,Biomaterials,16: 593-599(1995); Merin,E.W,PEO and Blood Contact in Polyethylene Glycol Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications,Harris J.M(ed),Plenum Press,NY,1992;Chaikof ら,A.I.Ch.E.Journal 36(7): 994-1002(1990))。PEO 含有膜は、フィブリンクロットの組織表面へのアクセスを弱め、CMC のみを含有する膜よりも弱めさせる。引張り強さ又は柔軟性について妥協することなく、CMC/PEO の柔軟性を増加させると、手術時の膜の取扱い特性を改良する。本発明で使用するポリエーテルの分子量の範囲は、5kd~8000kd に変えることができる。100kd~5000kd の範囲のポリエーテルは、よく作用し、かつ市販品を入手し易い。

ポリサッカライドとポリエーテルとの比率を変化させると、溶液の粘性が変化し(表4、5)、異なった程度の癒着予防及び抗血栓形成効果が生じる。CPS の割合を増やすと、生体付着性が高まるが、抗血栓形成効果が低くなる。一方、PE の割合を増やすと、抗血栓形成効果が高まるが、生体付着性が低くなる。カルボキシポリサッカライドの割合は、質量で、10%~100%でよく、好ましくは 50%~90%、最も好ましくは 90%~95%である。逆に、ポリエーテルの割合は、0%~90%でよく、好ましくは 5%~50%、また最も好ましくは約 5%~10%である。

CPS と PE との会合複合体の会合の強さ及びそれによる物理的性質は、結密に調整される。会合複合体の pH を小さくすると、水素の架橋の量が増加する。同様に、膜のカルボキシル基の置換度を高めると、いずれの pH においても会合複合体内の架橋が増加して、溶解性が減少することで複合体の生体吸収性は生体適合性が低くなる。低 pH のポリマー溶液から作られた膜は、高 pH を有する溶液から又はヒドロゲルで作られた膜より、一般的により硬く剛性であり、溶解が遅く、それゆえ組織内での滞留時間が長い。低 pH 膜は、一般的に、癒着形成時間が長い状況で、或いはゆっくり治る組織内で有用である。このような状況は、靱帯及び腱の手術からの回復において生じ、組織は特徴的にゆっくり治る。従って、持続性膜は、それらの組織間での癒着形成を最少化できる。しかし、低 pH 膜は、触感が粗く、折れ曲がるとクラックが生じ易く、粉砕し易い。対照的に、高 pH の溶液から作られた膜は、低 pH の溶液から作られた膜より柔軟で使いやすい。それらは、低 pH で作られた膜より生体付着性であり、速く生分解するので、癒着形成時間が短い場合に有用である。これらの膜は、感触が滑らかで、成形しやすく、かつ低 pH の溶液から作られた膜に比し、ずっとクラックを生じ或いは粉砕することなく、折り曲げることができる。本発明の会合複合体の pH は、1~7 であり、好ましくは 2~7、さらに好ましくは 3~7、さらに好ましくは 3.5~6.0 である。特定用途では、pH は約 4.1 が好ましく、本発明で想定した用途の大部分において、生体付着性、抗癒着特性、生体吸収速度及び生体適合性のバランスが好ましい。生体付着は、高分子の生体組織への付着として定義される。生体付着は、その潜在的なバリアは手術部位に配置された後そこから滑ってはいけないので、手術の癒着防止において重要である。CMC 及び PEO は両方とも個々に生体付着性である(例えば、Bottenberg ら、J.Pharm.Pharmacol.43 : 457-464 (1991) 参照)。水にさらされると膨潤することで知られる他のポリマーのように、CMC/PEO 膜も生体付着性である。水和は、膜の生体付着に寄与する(Gurney ら、Biomaterials 5 : 336-340(1984) ; Chen ら、Compositions Producing Adhesion Through Hydration, In: Adhesion in Biological Systems, R.S. Manly (Ed.) Acad. Press NY (1970), Chapter 10)。この現象の理由としては、水和が増すと、CMC 上の電荷がより露出されて組織タンパクに結合し易くなるということが考えられる。しかし、過剰な水和は生体付着にとって有害である。従って、膜の生体付着を調節する方法は、膜の水和特性を調節することである。本発明の膜は、PBS 溶液中で速く水和する(ず 3)。この挙動は、手術の時湿性組織に配置される膜の挙動を模している。膜の水和はそのバリアの厚みと柔軟性の両方を増加させ、これにより、癒着形成しうる期間、膜を組織の形態と一致させて切り離すことができる。最適な癒着防止のために好ましい水和率 (% 水の吸収による質量の増加) は、500%~4000%、さらに好ましい比率は 700%~3000%、また、癒着軽減に最も好ましい水和率は、約 2000% である(ず 4)。

会合複合体の pH を減じることに加え、カルボキシル置換の程度を高めた CPS を使用して、高分子間会合の増加が達成される。CPS 上のプロトン化されうるカルボキシル残基の密度を高くすることによって、かなり高い pH においても会合複合体の形成が増加しうる。置換の程度は、0 より大きくなければならない。

すなわち、いくらかの水素結合を形成しうるカルボキシル残基がなければならない。しかし、理論的に、セルロース誘導体に対して上限は 3 であり、サッカライドの 1 モルに対して 3 モルのカルボキシル残基が存在する。従って、本発明の最も広い適用では、該 d.s. は 0 より大きく 3 以下である。好ましくは該 d.s. は 0.3~2 である。0.5~1.7 の間の d.s. を有する CPS はよく作用し、約 0.65~1.45 の d.s. を有する CPS はよく作用し、かつ市販品を手入れし易い。

本発明の複合体は、体内での滞留時間が有限とされる。手術部位に配置されると、乾燥膜は即座に水和してゲル様のシートになり、限定された期間バリアとして機能するように設計される。実質的に治癒するとすぐに、該抗癒着バリアは自然に分解し、その成分は体から除去される。体から除去するのに要する時間は、食品及び薬の規制が増すので、好ましくは 29 日を超えないべきである。デバイスの投与は、体内に 30 日以上残存するものである。

CMC/PEO 複合体の生体吸収の機構は、よくは解っていない。しかし、生体吸収過程の初期段階は、CMC と PEO との網目構造の溶解である。従って、複合体の溶解性を高めると、組織からの構成成分除去の容易性が高まる(ず 5)。CMC 及び PEO は溶解すると、循環器系に拡散して肝臓及び腎臓に運ばれ、代謝され又は別の方法で体から除去される。さらに、酵素作用も炭水化物を分解できる。好中球及び他の炎症性細胞に含まれる酵素は、ポリマーの網目構造を分解してその構成成分を体から除去する速度を増すことができる。膜の分解及び溶解速度と分解速度は、会合複合体形成時の pH の厳密な調節、CPS/PEO 比を変化させること、また CPS の適切な置換度及び PE と CPS の分子量を選択することによって、操作される。CPS の分子量を少なくすると、その溶解性が増す。(Kulicke ら、Polymer 37(13) : 2723-2731(1996))。膜の強度は手術用途に合わせることができる。例えば、特定の手術用途 (例えば、脊椎又は腱) は、他の場合 (腹腔内用途のような) より、強く、耐久性の膜を必要とする。上述の実験変数の操作によって、体内での滞留時間が異なる製品及び用途を得ることができる。

本発明の複合体の生体適合性はその酸性度の関数である。高い酸性度の複合体は、より中性の複合体より全体でかなり多くの酸負荷を組織に与える。さらに、水素イオンが複合体から速く解離するほど、生理機構はより速く酸負荷を緩和し、希釈した他の除去機構によって補填しなければならない。生体内の膜により除去される速さ及び酸の総量を模倣するため、PBS 溶液に膜を入れて PBS の酸性化の程度を測定する。膜の pH に加え、膜の組成も体に送達される酸負荷に影響を与える。ず 6 及び表 3、表 6 は、膜による組織への酸の送達を模倣するために設計した研究結果を示す。

膜の製造後、膜を変更して使用者の特定の要求に合わせてもよい。例えば、比較的生体吸収性の膜は、限定するわけではないが、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸又は硝酸で例示される酸を含有する溶液で処理する、“酸性”法によって、より不溶性にすることができる。

逆に、比較的吸収性でない酸性膜は、アンモニアのようなアルカリで(“アルカリ”法)、又はリン酸緩衝液 (PB) 若しくはリン酸緩衝食塩水 (PBS; “緩衝”法) のような緩衝溶液で、それを調節してより生体吸収性及び生体付着性にすることができる。pH7.4 の PBS の 10mM 溶液は、リン酸緩衝液の生体適合性のため好ましい。さらに、膜の pH は、低 pH で作られた膜の利点をなくさないように、緩衝させることができる。従って、最初の酸性膜は、その pH がアルカリ又は緩衝処理で高くなったとしても、ゆっくり水合し、比較的長い滞留時間を有する。

表 7 は、CMC/PEO 膜の特性におけるアンモニア処理の効果を示す。高酸性の最初の膜 (pH2.03) は、最初 pH7.40 の PBS 緩衝溶液を酸性化してその pH を 4.33 にする。この膜を PBS 溶液に浸漬すると、それは水合してその最初の乾燥質量の 2.5 倍以上になり、PBS 中で 4 日後には、この膜はその最初の質量の約 29% を失った。

同じ膜で、0.5N アンモニア溶液中で 1 時間インキュベーションすると膜は実質的に中和され、緩衝溶液にほとんど水素イオンを遊離せず、PBS 溶液の pH はほとんど中性 (pH7.28) のままであった。

表 8 は、CMC/PEO 膜の特性におけるリン酸緩衝液処理の効果を示す。漸次的な長い滞留時間のために 50mM リン酸緩衝液で処理された膜は、PBS 溶液への酸の遊離が減少することで判るように、ますます中性の pH になった。同様に、PBS (10mM リン酸緩衝液) は膜中の酸を中和した(表 9)。従って、組織に生理的に適合する膜が作られ、さらに、会合複合体を生じる酸性の最初の pH で作られるので、膜は最初の複合体の所望の特性を保持している。

さらに、多層膜を製造し、例えば、高 pH で作られた外側の膜で囲まれた低 pH の内側の膜を取り入れることができる。この構成により、内膜の長期間の安定性と低速の生体吸収性を有する膜を導入することができる。組織障害や炎症反応のような低 pH 膜の副作用を最小化する。さらに、高 pH の外側部分は、低 pH 膜より生体付着性が高く、このような膜をよりしっかりと部位に留めておくことができる。

また、多層膜は 1 層として純粋な CPS 又は PE 膜を含んでもよい。このような膜は、CPS 及び PE の混合物である側の柔軟性、抗癒着性、及び溶解性を有し、一方で純粋な材料の特性を有する。例えば、生体付着性は CPS の特性であり、純粋な CPS は高度な生体付着性を有するだろう。代替的に、純粋な PE 膜は最も高い抗血栓形成特性を有するだろう。従って、各構成成分の所望の特性を取り入れた膜を作ることができる。

手術部位に運ばれる薬剤を取り入れた膜を作ることができる。膜に薬剤を取り入れることは、Schiraldi らの米国特許第 4,713,243 号に記載されている。その取入れは、製造段階で、又は後に挿入前の膜の調整段階であってもよい。癒着形成を阻止しうる薬剤は、ヘパリ

ン又は組織のプラスミノーゲン活性剤のような抗血栓形成剤、アスピリン、イブプロフェン、ケトプロフェン、又は他の非ステロイド系抗炎症剤のような薬剤を含む。さらに、ホルモン、走化因子、鎮痛剤又は麻酔薬を、製造時又は調整時のいずれにおいても膜に加えてよい。膜の構成成分及び膜の製造に適合するいずれの薬剤又は物質を、本発明で使用できる。

本発明の組成物が使用できる手術のタイプは限定されない。外科手術処置の例としては、腹腔、眼科、整形外科、胃腸、胸部、頭部、心臓、尿管、婦人科、関節鏡検査、泌尿器科、可塑性、又は筋骨格の処置がある。

関節鏡及び関節鏡検査のうち 67%~93% で、癒着形成が起こる。特有用な腹腔の処置としては、腸、虫垂、胆嚢切除、ヘルニアの修復、腫膜の癒着溶解、腎臓、膀胱、尿道、及び前立腺の手術がある。

婦人科の処置は、卵巣、ファロピウス管及びフイムブリエに付着した癒着による両側の卵管狭窄に起因する不妊症治療のための手術を含む。このような手術は、卵管開口術、卵管刺離術及び卵巣刺離術を含む。さらに、婦人科の手術は、子宮内膜症の除去、新生の癒着形成の防止、子宮外妊娠の処理、子宮又は底の筋腫摘出術及び子宮摘出術筋を含む。

筋骨格の手術は、腰椎椎弓切離術、腰椎椎間板切除術、屈筋腱手術、脊椎の固定、関節の交換又は修復を含む。

胸骨切除術を含む胸部手術は、最初の手術後に、心臓と大動脈との間の癒着形成のため危険性がある。胸部手術は、バイパス吻合及び心臓弁の交換を含む。

多くの頭蓋手術の手順は、一を超える処置を必要とするので、頭蓋骨、硬膜及び皮質を含む癒着のために二回目の処置を複雑にする。

眼球手術用途は、斜視の手術、緑内障のフィルタリング手術、及び流涙のドレナージの処置を含む。

拉癒着膜の試験及び評価の一般的方法 膜の水和率 膜の水和速度及び水合率を測定するため、数片の好ましくは 160mg の乾燥膜を 1 枚ずつガラスびんに入れ、20ml のリン酸緩衝食塩水溶液 (PBS, 10mM, pH7.4, Sigma Chemical Company, St.Louis, MO) を添加した。膜は水合してヒドロゲルの柔らかいシートを生成した。一定時間 (通常、1 時間又は 5 日) 後、水合した膜の各々をその試験びんから取り出し、ポリスチレンのシャーレに入れた。ディスクポーターザルビペットを使用して膜をディッシュペーパーで吸い取って過剰の水を除去した。そして、各膜を秤量し、水合率を下式に従って決定した：

CPS/PE 膜の溶解性 CPS/PE 膜の溶解性を決定するため、膜の化学的成分の関数として、膜の水合中の相対的な溶解度及びその水溶液の安定性を測定した。膜の水合中の溶解度は、膜の生体内吸収時間に関連する。

通常、試験は、上述した水合の測定と組み合わせて行う。しかし、水合試験の際、膜は PBS に曝されるので塩を取り込む。この塩が加わるため人為的現象的に乾燥質量が多くなる

。そこで、水和率測定後、脱イオン水（30ml、30 分間）に膜を浸漬させてポリマー網目構造に取り込まれた塩を除去した。水をデカントして新しい 30ml アリコートの脱イオン水を加えた。膜をさらに 30 分間浸漬し、シャーレから取り出して、吸い取り、乾燥し、500の自然対流式オーブンに入れて乾燥した。

乾燥時間は膜によって吸収された水の量に苛った。水和率の高いゲル様の膜は乾燥するのに 24 時間までかかったが、水和が不十分な膜は数時間程度で乾燥した。膜の過剰な水の除去した後、膜を 1-2 時間室温で平衡化してから秤量した。

一定の質量が得られるまで秤量を繰り返した。一般に、この間に空気中の湿気を吸収して膜が再び水和するものもあった。

上記の脱塩化プロセスの後、30ml の脱イオン水を含有するシャーレに膜を入れ、20 分から 5 日の期間で水和させた。予備的な試験では、pH が 6 以下の範囲の膜は 1 時間の脱塩化の間には分解しないことがわかった。

膜の溶解性 (S) は、下式を用いて計算した：

浸漬前の乾燥質量は脱塩化後の質量であり、浸漬後の乾燥質量は水中での水和段階後の質量である。

膜によって送達される酸負荷の決定：この試験は、上述の水和及び溶解度試験と組み合わせで行った。この試験により、動物又はヒトの被検体に膜が移植されたときに膜が組織に送達しうる酸負荷の指標を得る。製造後、膜を PBS 溶液に入れると、複合体は経時的にプロトンを解離し、その結果、PBS 溶液の pH かなり減少した。

酸負荷試験は、モデル 40pH メーター (Beckman Instruments, Fullerton, CA) を使用して行った。160mg の乾燥膜をガラスびんに入れて 20ml の PBS を添加した。PBS 溶液の pH の初期値は 7.40 であった；この溶液の pH は、膜のポリマーが部分的に溶解してプロトン化されたカルボキシル残渣をさらすにつれて、徐々に減少した。高度に水和した膜 (pH4-7) では、水和プロセスで生じる静水力によってポリマー鎖が引き離されるので、このプロセスが促進された。

実施例 1：以下の実施例で、カルボキシポリサッカライド/ポリエーテル膜を、典型的なカルボキシポリサッカライドとして CMC について、典型的なポリエーテルとして PEO について記載する。他のカルボキシポリサッカライド及びポリエーテルの会合複合体を作ることができ、同様に使用できることが分かる。従って、本発明は、これらの実施例に限定されず、本発明から逸脱することなく、如何なる均等の方法でも実施できるものである。

実施例 1：中性の CMC/PEO 膜 タイプ 7HF PH (MW 約 700kd；ロット FP 10 12404) カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) を Aqualon Division of Hercules (Wilmington, DE) から得た。約 900kd の MW を有する PEO を Union Carbide (Polysar WSR-1105 NF、ロット D 061, Danbury CT) から得；約 1000kd の MW を有する PEO

を RITTA Corporation (PEO-3、ロット 0360401、Woodstock, Illinois) から得た。

以下のように、65% CMC 及び 35% PEO の組成の膜を作った：6.5g の CMC 及び 3.5g の PEO を秤量皿内でドライブレンドした。モデル 850 実験室ミキサー (Arrow Engineering, PA) を使用して 500ml の脱イオン水をポルテックスに入れて約 750RPM で撹拌した。この撹拌した水に、CMC と PEO のドライブレンドを約 2 分間かけて徐々に分散させた。ポリマーが溶解するにつれて、ポリマー溶液の粘度が上昇し、撹拌速度はだんだん遅くなった。約 15 分後、撹拌速度は 60~120RPM になり、撹拌を約 5 時間続け、何らの凝集塊も見られない、2% の総ポリマー濃度 (wt/wt) を含有する均一な溶液を得た。

CMC 及び PEO を予備ブレンドしないで、膜の鑄造溶液を生成する代わりの方法は、ポリマーを個々に溶解させることである。そして、アニオン性ポリマー、CMC は、適量の HCl を添加して酸性化することができる。例えば、10.0g の CMC7HF を 500ml の脱イオン水に溶かして調製した 2% CMC の 500ml バッチに、2700µl の濃 HCl を加えて pH2.6 に酸性化した(“溶液 A”)。別に、2% PEO のバッチを作った(w/v 900,000MW, “溶液 B”)。そして、実施例 1 の実験室スターラーを用いて、60RPM で、溶液 A と B を特定の比率で完全に混合した。実施例 1-2 においては、総ポリマー濃度を 2% に維持した。

20g の溶液を 100x15mm の円形のポリスチレンシャーレ (Fisher Scientific, Santa Clara, CA) に注いで溶液から膜を鑄造した。シャーレを 40°C-45°C に設定した実験室用自然対流式オーブンの中に入れ、760Torr で一晩中乾燥させた。生成した膜を、Exacto ナイフを用いて慎重にポリスチレン表面からはがした。

より大きな膜用には、243x243x18mm のポリスチレンシャーレ (Fisher Scientific) を使用した。円形膜と同様な面積比の質量を用いて(この場合、220g の鑄造溶液を使用した)、乾燥質量約 4.5g の膜を得た。膜は、均一で滑らかであり、かつ柔軟性を示した。この膜の 160mg を 20ml の PBS 溶液 (pH7.4) に入れても溶液の pH は変化しなかった。乾燥引張り強さ及び%破断点伸びは、酸性化鑄造溶液から作られた対応する膜よりわずかに高かった(表 2)。脱イオン水又は PBS に入れると、膜は過剰に膨潤し、急速に (10 分以内に) そのシート構造を失い、ゲル様の物質を形成して、最終的にはポリマー溶液に均一に分散した。

実施例 2：適度に酸性化された CMC/PEO 膜及びヒドロゲル 中間の pH 域 (2.5<pH<7) に酸性化された膜の製造方法は、最初は実施例 1 で述べた方法に従う。実施例 1 で特定したポリマーを含む中性のポリマーブレンド溶液に、60-120RPM で 1 時間撹拌しながら濃塩酸 (HCl, 37.9%, Fisher Scientific, Santa Clara, CA) を添加して酸性にした。最初は、溶液中に白色の沈殿物が形成し；その沈殿物は徐々に分散して安定した溶液になった。一般的に、安定した鑄造溶液の所望の濃度を得るためには、2% の総ポリマー濃度が有効であることがわかった。より高いポリマー濃度からは、粘度が高すぎて注ぎ難いポリマー溶液が生じた。より低いポリマー濃度の場合には、同様の膜質量のためには鑄造溶液

を多く必要とし、同等の膜に対して乾燥時間がかなりかかった。実施例1の65%CMC/35%PEO ポリマーブレンド500mlでは、鑄造溶液のpHを3.1にするためには1500 μ lの濃塩酸を必要とする。この酸性化プロセスによって、最初のポリマー溶液の粘度は、少なくとも50%下がった。

種々のポリマーブレンド(100%CMC及び100%PEOも同様に)についての滴定曲線を図2に示す。図2は、CMC/PEO混合物の組成に依存する所望のpHの鑄造溶液を調製するのに必要なHClの量を示す。100%CMC(■)から得られる膜は、他の組成よりも同程度に酸性にするためには多くの酸を必要とする。PEOの濃度を増やすとCMCの濃度を減らすと、鑄造溶液を所望のポイントに酸性化するのに必要な酸の量が減少する。PEOの濃度を20%に増やしても、PEOの分子量が200k(●)か1000kd(▲)に関係なく、効果が少ない。PEOの濃度を40%(+)又は100%(○)に増やすと、所望の鑄造溶液のpHを達成するのに必要な酸の量はさらに減少する。

ヒドロゲルの粘度 ヒドロゲルの抗癒着特性は、その粘度に依存するので、鑄造溶液のpHとヒドロゲルの粘度の関係を測定した。BrookfieldTM粘度計を使用して22 $^{\circ}$ CにおけるPCS/PE溶液の粘度を測定した。使用した方法は、小冊子Cellulose Gum, Hercules Inc., Wilmington, DE, (1988), 28 ページに記載した。手短に言えば、試験する溶液の組成を選択し、Cellulose Gumの29ページの表XIを参照してスピンドル番号とスピンドルの回転速度を選択する。粘度測定は、溶液攪拌後2時間以内に行う。スピンドルを溶液に接触させ、3分間スピンドルを回転させた後、Brookfield デジタル粘度計(モデル DVI-II)で直接センサポアズ値を読みとる。我々は、7HF PH CMCと1000kdPEO(RITA)からpH7.5で調製した65%CMC/35%PEO溶液を研究した。他の65%CMC/35%PEO溶液をpH3.1で調製した。

表1 ヒドロゲルの粘度における鑄造溶液のpHの効果

表1は、鑄造溶液の酸性化による粘度の変化を示す。pHを7.5~3.1に減少させると、半分以上鑄造溶液の粘度が下がった。ヒドロゲルの粘度は癒着防止能力に関係するので、長時間一カ所に留まる能力のため、より高いpHのゲルは、より高い抗癒着特性を有するだろう。さらに、鑄造溶液は、pHと共に粘度によっても特徴づけられる。従って、pHの測定が困難又は信頼できない場合は、粘度を測定すると好ましい。膜の製造のため、弱く水素結合した分子間PEO-CMC複合体を含有する酸性化鑄造溶液を、次にポリスチレンのシャーレに注ぎ、実施例1で記載したように乾燥する。乾燥後、物理的性質を測定した。

CMC/PEO膜の物理的性質 膜の引張り強さ及び伸びは、幅12.7mmの狭い点のある“イヌの骨”の形をした膜片について測定する。そして、膜を1トンのロードセルを備えたInstronTM試験機に取り付ける。クロスヘッド速度を5.0mm/分に設定する。膜の厚み、引張り強さ、及び伸び(膜の%破断点伸び)を測定した。所望の試験領域で失敗した試料についての結果を報告する。試料の半径又はグリッブについて失敗した試料は、不適当の

試験と考え、それら試験結果は捨てた。

表2 CMC/PEO膜の物理的性質

膜は、すべて厚み0.1mm未満である。膜のpHを中性から減少させると、引張り強さが減少し、破断点における弾性(%伸び)が減少する。同様に、PEO濃度を低くすると、膜の引張り強さ及び伸びが減少する。

PBS中でのCMC/PEO膜の水和 膜の生体付着性を評価するために、以下に述べる方法に従って、CMC/PEO膜の水和の速度及び程度を測定した。

図3は、本発明のCMC/PEO膜の水和の時間経過を示す。pH4.31で80%CMC/20%PEO(m.w.900kd)から製造した膜は、急速に水和した(●)。PBS中で2時間後、その水和率((ウェット質量-ドライ質量)/ドライ質量;%膨潤)は6000%以上に増加した。PBS中で5時間後、この膜の水和率はほぼ8000%であった。この高度に水和した膜は、その粘着性を失い、その後実質的に分解した。膜のpHを3.83以下に減少させると、膜は2時間以内でほとんど平衡点まで水和し、少なくとも40時間水和の程度及び粘着性を維持した。水和の程度は、高度に膨潤する能力のある最も酸性度の低い膜を有する膜のpHに依存した。3.83のpHにおいて(▲)、膜はほぼ6000%の水和率を有し、一方、2.0のpHにおいては(○)、水和率は300%未満であった。pHが3.2~4.3の範囲内で、水和の程度はpHに影響されやすい。

図4は、CMC/PEO膜の水和における膜の組成及びpHの効果について、他の研究のまとめを示す。水和は、PBS中で少なくとも6時間後で、水和の程度がそれぞれの膜についてほぼ同等に達した時に測定した(図3参照)。調べた各組成について、膜のpHを高くすると、膜の水和率は増加した。100%CMCの膜(■)は、その水和率が膜のpH1.7における約100%から膜のpH3.4における1300%以上に増加した。80%CMC/20%PEOから得られた膜については、PEOの分子量が水和にわずかに影響した。900kdのPEOで作られた膜(▲)は、200kdのPEOで作られた膜(●)より、所定のpHにおいてわずかに多く水和した。

の100%CMCで作られた膜(■)と同様に水和した。最終的に、50%CMC/50%PEO(900kd)で作られた膜は、膜のpHが低い(<2.6)ものを除き、他の膜のいずれよりも水和が少なかった。

CMC/PEO膜の溶解性 CPS/PEポリマーの生分解性は溶解性に関係するので、以下に述べる方法に従って、PBS中で少なくとも4日後の膜の溶解度を測定した。図5は、PBS溶液中の膜の溶解性における膜のpH及び組成の効果を示す。膜を種々のCMC/PEO組成及び種々の膜pHで作った。すべての膜で、膜のpHが高いと、PBS中での溶解度が高かった。100%CMCの膜(■)は、最も溶解しなかった。PEOを含有する膜はより溶解しやすく、900kdPEOから作られた膜(▲)は、200kdPEOから作られた膜(●)より溶解し

なかった。また、PEOの百分率を50%に増やすと(+)、膜の溶解度がさらに高くなった。CMCの分子量を小さくすると(TM_F；*)、溶解度が増した。また、CMCの置換度を0.84から1.12に高め

の溶解性に及ぼすpHの効果が大きくなった。他の膜については、pHを高める効果は、膜の組成とは関係なく同程度を示した。従って、直線の傾きは同様であった。

これらの結果は、膜の組成に関係なく、膜の溶解性は、膜のpHを高めることによって増すことを示している。さらに、生体吸収性は可溶化が必要なので、より溶解性の高い膜は、低溶解性の膜よりも早急に体から取り除かれるだろう。

CMC/PEO膜の生体適合性 生体適合性は、組織に送達される酸負荷に関係するので、以下に述べるような好適なインビトロモデルとして、PBS溶液にCMC/PEO膜によって送達される酸負荷を測定した。まず、種々の組成のCMC/PEO膜にさらしたPBS溶液の酸性化の時間経過を測定した。

表3 CMC/PEO膜によるPBSの酸性化の時間経過 PBS溶液中の時間(時間)

表3は、本発明のCMC/PEO膜によるPBS溶液の酸性化についての速度論を示す。PBS溶液に添加されると、膜は酸を溶液に遊離するので、溶液のpHは低くなる。このプロセスは、高分子量のPEOと結合するものを含む膜については、最初の1時間で約1pH単位で溶液のpHが減少しながら、ゆっくりと起こる。これは、よりpHの高いポリマー溶液と同様に、よりpHの低いポリマー溶液から製造された膜についても真実である。pHの残りの減少は、続く20時間の間に起こり、その時間で溶液のpHはほぼ一定になった。PBS中で45時間までに、pHは6.0以下に下がった。

さらに、PEOの分子量を少なくするにつれて、高分子量のPEOから作られた膜より、溶液のpHは早くかつ大きく減少した。この結果は、CMCの酸性カルボキシル残基を遮蔽する高分子量のPEOの能力により、カルボキシルの水素イオンの解離を減少させるからだろう。

これらの結果は、高分子量のPEOは、酸の組織への送達を遅延させ、過剰な酸性化から組織を保護することを示唆している。さらに、プロトンは生体内で遊離されるので、それらは細胞外の領域で希釈され、生理的緩衝液で緩衝され、最終的にリンパ系及び循環系によって組織から取り除かれるだろう。プロトンが遊離される間のかのりの長時間に渡って、生理的希釈、緩衝、及び分離機構は、酸負荷を除去し、組織のpHを許容される範囲に維持する。従って、これらの膜は、送達される大きな酸負荷に起因する過剰な組織破壊を引き起こさず生体内に移植するのに好適である。

図4は、PBS溶液のpHを、膜pH及び膜の組成の関数として変化させた場合の研究結果を示す。膜をPBS溶液中に、酸性化が平衡に達するまで4～5日間置いた(表3)。最も酸性化が低かった膜の組成は、ブレ調整した80/20/300kの膜であった(o)。これらの膜は、

PBS中に膜を浸漬してそれらを再乾燥する工程を付加する以外は、上述と同様に作った(実施例7.9参照)。PBS中で製造された80/20/200kの膜(+)は、次に少ない酸負荷を送達し、50/50CMC/PEO(900k)系の膜(o)は三番目に少ない酸負荷をPBS溶液に送達した。100%CMCから作られた膜(●)、80/20/200kの膜(●)、及び80/20/900kの膜(▲)は、次第に多くの酸をPBSに送達し、置換度1.12のCMCで作られた80/20/300k系の膜は、最も多く酸をPBS溶液に送達した。

また、図6は、PBS中に浸漬することで調整した膜は、PBS溶液に送達される酸負荷を最も減少させることを示している。例えば、最初のpHが3.4で製造されたブレ調整膜は、PBS溶液のpHを7.4から7.0に減少させただけであった。従って、長期間の持続が必要用途においては、酸性化が最少である場合を除き、PBS中で酸性膜をブレ調整することが望ましい。

実施例3: 種々のPEO/CMC比の膜 8.0gのCMCと2.0gのPEOを500mlの脱イオン水に溶かし、80/20 CMC/PEO膜の500mlバッチを得た(CMC及びPEOの原料、及び溶液処理は実施例1と同様)。低速(60RPM)で攪拌しながら、このポリマー溶液200gを1500ulの5N HCl (LabChem, Pittsburgh, PA)で酸性化すると、pH3.17で平衡になった。次いで、その酸性化ポリマー溶液をポリスチレンシャーレに注ぎ、実施例1で述べた同様の方法で乾燥した。CMCとPEOの相対量を変化させることによって、種々の組成の膜を得た。100%CMC膜は、PEO含有膜よりも脆弱で柔軟性がなかった。我々の目的のためには、70%以上のPEOを含む膜は水性環境下では不安定なので、一般的に好ましくない。

表4 種々のCMC/PEO比を有する溶液の粘度 (cps, @スピンドル#6, 200) スピンドルRPM

表4は、溶液の粘度におけるCMC/PEO比の効果を示す。2つの異なるpHで、PEO (m.w.: 1,00,000)の種々の百分率について膜を作った。CMCを高率で含む溶液は、CMCの含有率が少ない溶液より粘性であった。さらに、より弱酸性の溶液はより強酸性の溶液より粘度が高かった。この関係は、100%CMC溶液を除き、すべての溶液について維持された。pH2.6における粘度は、pH4.0における粘度より僅かに高かった。これは、低pHにおけるCMC分子間の会合に起因するだろう。

2つの溶液を混合すると、予想以上の粘度減少が得られた。例えば、溶液A (pH2.6)及びBを50/50比で混ぜた場合、85%の粘度減少を達成した。スピンドルRPM 2.5で、原料2%CMC溶液(w/w)、pH2.6の溶液は、42,400cpsの粘度であり、2%PEO溶液は280cpsの粘度であった。従って、混合物の粘度が構成成分の粘度の平均であるとするば、50/50 CMC/PEO溶液は、 $(42400+280)/2=21300$ cps(CMCのみの粘度から約50%の粘度が減少)と予想できる。しかし、実際のCMC/PEO (50/50)溶液は、たった4,800cpsの粘度であった。同様な、予想以上の粘度減少が、Ohnoら(Makromol.Chem., Rapid Commun. 2, 511-515, 1981)のデキストランとイヌリンとのPEO

ブレンドについて報告されている。

さらに、100%CMCとCMC/PEO混合物についての酸性化によって生じる粘度の相対的な減少を比較することによって、CMCとPEOの分子間の複合体生成についての証拠が示される。表4は、2.5rpmにおいて、pHが4.0から2.6に低くなったとき、CMC溶液の粘度は本質的に変化しないままであることを示す。しかし、CMC/PEO混合物については、酸性化は粘度の大きな減少の原因になった。減少は、66%/33%、50%/50%、33%/66%、及び25%/75%のCMC/PEOの混合物について、それぞれ、69%、63%、53%、及び42%であった。

従って、CMCとPEOの間には分子間結合があり、我々は、PEO分子がCMC分子の間に分散し、CMC分子間の分子間結合を妨げるものと考える。このような理論は観察を説明できるが、本発明を何ら分子間の一理論に限定するものではない。他の理論で観察を説明してもよい。

次に、種々のCMC/PEO比の膜の製造後、我々は、上述の方法を用いて、膜の水和、酸負荷、及び溶解性について研究した。

表5 水和、酸負荷及び溶解性についてのCMC/PEO比の効果

表5は、水の取り込み、酸性、及び質量減少の%についてのCMC-PEO膜におけるPEO濃度を増加させることの効果を示す。膜のPEO含量を増加させると、水和率及び溶解性は増加し、PBSに送達される酸負荷は減少した。これらの結果は、膜のCMCの総量が減少するにつれ、酸負荷が減少することを示している。

さらに、種々のCMC/PEO比の効果を図5(溶解度対膜のpH)、及び図6(膜の酸性度対PBS溶液のpH)に示した。

実施例4：種々の分子量のPEOの膜 種々の分子量のPEOの膜を2%(w/v)PEO溶液と、2%(w/v)CMC(Aqualon Division of Hercules (Wilmington, DE) から入手したタイプ7HF PH(ロットFP 10 12404))とを混合して製造した。分子量8000 (8K) のPEOは、Dow Chemical, Midlands, Michigan から Polyglycol E8000NFとして入手した。分子量300,000(300K)、900,000(900K)、及び5,000,000 (5M) のPEOは、すべて Union Carbide から入手した。実施例1で使用した方法に従い、300mlの脱イオン水に6.0gのPEOを溶かして、PEOの2%溶液を作った。同様に、CMC原液は、10.0gのCMCを500mlの脱イオン水に溶かして作った。CMC原液に2100 μ lの濃HClを添加して製造溶液のpHを3.37に減じた。

50%CMC/50%PEO(8K)膜は、40.07gのCMC原液と40.06gのPEO(8K)原液を混ぜて作った。その製造溶液を酸性化してpH3.46にした。50%CMC/50%PEO (300K) 膜は、39.99gのCMC原液と40.31gのPEO (300K) 原液を混ぜ、HClを添加してpHを3.45に減じた。50%CMC/50%PEO (900K) 膜は、39.22gのCMC原液と39.63gのPEO (900K) 原液を混ぜ、HClを添加してpHを3.56に減じた。50%CMC/50%PEO (5M) 膜は、38.61gのCMC原液と40.00gのPEO (5M) 原液を混ぜ、HClを添加して

pHを3.55に減じた。

これら種々の酸性化 CMC/PEO 混合物を実施例1の方法に従い、鑄造し乾燥した。図7は、生成した膜の水和率に対するPEOの分子量の効果を示す。その結果、PEOの分子量を増やすと、水和率が増加するが、PEO分子量を900Kから5000kdに増やしてもほとんど水和の増加は見られないことがわかる。さらに、種々の分子量のPEOから作られる膜の違いは、図4-6に示したデータから観察できる。

実施例5：種々の分子量のCMCの膜 50%CMC/50%PEO膜は、CMC(Aqualon Division of Hercules(Wilmington, DE)から入手したタイプ7MF PH; ロットFP 10 12999)と、分子量900,000のPEO (Union Carbide) とから作った。"高粘度"のタイプ7HF CMCとは対照的に、7MF CMCは溶液の粘度がかなり低い。タイプ7MFの平均分子量は、7HFタイプのCMCが700kdであるのに対して約250kdである。実施例1の方法に従い、5.0gのCMCと5.0gのPEO (900K) を予備ブレンド乾燥し、500mlの脱イオン水に溶解した。その溶液を950 μ lの濃HClで酸性化し、pHを3.48に減じた。20.0gの鑄造原液から膜を作った。

さらに原液を使用して、より酸性の膜を作った(pHが3.07、2.51、及び1.96の鑄造溶液を用いて)。膜を鑄造し、これらの酸性化溶液から乾燥した。乾燥後、上述のように、水和率、質量減少、及び酸負荷を測定した。表6を参照されたい。

表6 低分子量のCMCの特性

PBS溶液に5日間置くこと(酸負荷試験、上記参照)、各膜はPBS溶液のpHを低くした。3つの高pHの膜は、シート様の構造を失い、無定形な、拡散ゲルになった。最も酸性の膜だけが、その構造の統合性を維持した。この膜を他の膜と比較すると(図5)、pH2.0では、より低分子量のCMCからなる膜が最も溶けやすいことがわかる。このように、会合複合体の強度はCMCの分子量に依存する。

実施例6：種々の置換度のCMCを有するCMC/PEO膜 CMC/PEO膜を、タイプ99-12M3IXPのCMC (ロットFP 10 12459、置換度 (d.s.)

1.17、Aqualon Division of Hercules, Wilmington, DE から入手) と、分子量300,000のPEO (Union Carbide) とから作った。200mlのブレンドポリマー溶液を600 μ lの濃HClで酸性化して、pH4.07の原液を得た。この鑄造溶液20.7gをシャーレに注ぎ、実施例1に記載したように膜を乾燥した。原液の残りを使用して酸性度の高い膜を作った。それから膜の鑄造溶液のpHは、それぞれ、3.31、3.03、2.73、2.44、及び2.17であった。

図4-6は、CMC及びPEOの異なる組成の膜と比較した、これらの膜の特

入れたときに836%の水の水和率を有する他のCMC/PEO膜の水和率と同様であることを示している。しかし、他の測定された特性には相違がある。図5は、高置換度のCMCから作った膜は、他の膜に比し、最も溶解しやすい膜を生成することを示している。図6

は、高置換 CMC 製の膜は、PBS に最も大きい酸負荷を送達する膜を生成することを示す。このことは、如何なる pH においても、より高い置換度で作られたこれらの膜で、より水素イオンが解離し易いという見解と一致する。

実施例 7 : アンモニウム調整の膜 CMC/PEO 膜についてのアルカリ調整の効果を調べるため、3 種の乾燥膜 (約 160mg、組成: 80% CMC (7HF PH) / 20% PEO(300K) または 5000kd)) をシャーレに入れた。

30ml の 0.5N 水酸化アンモニウム(5N アンモニア、LabChem, Pittsburgh, PA を 10 倍に希釈して得た)を加えて膜を浸した。完全に浸すとすぐに、1 分或いは 5 分で膜に十分に染み込んだ。そして、膜をアンモニウム溶液から取り出し、過剰のアンモニウムをろ紙で吸い取り、450 の自然対流式オーブンに膜を入れて乾燥させた。

乾燥及び室温での予備平衡化の後、膜の質量を測定した。乾燥後、膜の水和率、酸負荷、及び溶解性を測定した。その結果を表 7 に示す。

表 7 CMC/PEO 膜におけるアンモニウム調整の効果

表 7 は、アンモニウム処理が実質的に PBS 溶液に送達する酸負荷を減らすことを示している。拡大解釈すれば、この効果は生体内で組織に送達される酸負荷を減少させることでもある。また、PBS の他の溶液に同じ酸負荷を送達する他の膜と比較すると、アンモニウム調整の膜は、溶解性が低いので、生体内残留時間が長い。従って、組織に剰余の酸をほとんど送達しない長滞留時間の抗癌薬膜を導入することができる。一方、調整されない膜は、pH が約 7.0 で急速に分解し、手術の癌予防防止についてほとんど有用でない。

最初の製造後に膜を処理すると、膜の酸負荷が減少した。対照 (アンモニウムに浸漬せず) に比し、すべての場合に、調整処理で、約 4 から中性の pH 値以上に pH が高くなった。また、対照に比し、調整処理は膜の水和率をも高めた。この水和の増加は酸性膜の 2 種については比較的少ないが、最も酸性の (pH3.1 の 80% CMC/20% PEO(5M)) 膜は高度に膨潤した。従って、この処理の効果は、膜の最初の条件に依存する。2 つの場合の (80% CMC/20% PEO(300kd)、pH2.03 膜について) アンモニウム調整に起因する全質量の減少は、対照の減少よりわずかに少ない。

この予想外の結果は、アンモニウム溶液中の塩の初期減少に次いで、PBS に浸漬している間に塩が消耗された膜中に塩を取り込むことに寄るのだろう。

実施例 8 : リン酸緩衝液を使用した調整膜 実施例 7 と同様に、製造後、膜をリン酸緩衝液 (50mM、pH7.40) で調整した。

1 片の乾燥膜 (0.163g ; 80% CMC (7HF PH) / 20% PEO(5000kd)、pH3.1) をシャーレに入れた。その膜を 30ml のリン酸二水素カリウム/水酸化ナトリウム緩衝液 (50mM、pH7.40 ; Fisher Scientific) に、5 分間浸した。5 分後、膜をその溶液から取り出し、過剰の緩衝液をろ紙で吸い取り、その膜を 450 の自然対流式オーブンに入れた。乾燥及び室温での予備平衡化の後、膜の質量は 1.42g であった (すなわち、13% の質量減少)。他の

膜は、乾燥前に 20 分又は 60 分間緩衝液に浸漬させた。乾燥後、膜を上述のように試験した。これら膜の各々について水和率、酸負荷、及び溶解性 (PBS 中で 4 日後) を測定し、その結果を表 8 に示した。

表 8 CMC/PEO 膜におけるリン酸緩衝液調整の効果

表 8 は、アンモニウム調整と同様に、リン酸緩衝液調整により、PBS 溶液に送達される酸負荷を中和すること示している。さらに、リン酸緩衝液にさらす時間を増やすと、膜の酸性を漸進的に中性化した。1 時間のインキュベーション後、pH は、約 4.3 から 7.30 に高まった。これらの膜は、少なくとも 3 日間そのまま PBS 中で維持された。対照的に、最初の pH7.0 でかつ上記のように作られた膜は、急速に水和し、完全に溶解し、数時間以内に統合性を失った。このように、アルカリ又は中性のリン酸緩衝液で調整した酸性膜は、生体適合性 pH を高度に維持しながら、膜の溶解性を減じること (生体内での滞留時間の増加) ができる。さらに、他の中性又はアルカリ性溶液 (例えば、pH9.0 のホウ酸-KCl、NaOH、0.1M ; Fisher Scientific) に浸漬しても、最初の膜の酸性度を減じる効果があると予測できる。

実施例 9 : PBS を使用した調整膜 等張性のリン酸緩衝液生理食塩水が膜によって送達される酸負荷を減じることができるかどうかを決定するため、緩衝液として PBS を使用すること (10mM、pH7.4、3 回洗浄、それぞれ 20 分) 以外は、実施例 8 と同様の上記実験を繰り返した。

1 片の乾燥膜 (質量 0.340g ; 組成: 80% CMC (7HF PH) / 20% PEO(300kd)、pH3.1) を、リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) 溶液 (10mM、pH7.40 ; Sigma Chemical Company、St. Louis, MO) を含有するシャーレに入れ、20 分間浸させた。溶液を膜からデカントし、新たに PBS を添加することによって、浸漬操作をさらに 2 回繰り返した。次に、膜を PBS 溶液から取り出し、上述のように吸い取り、乾燥させた。乾燥及び室温での予備平衡化の後、その膜の質量は 0.274g (19.4% の質量減少) であった。乾燥後、上述と同様に水和率、酸負荷、及び溶解性を測定した。その結果を表 9 に示す。

表 9 CMC/PEO 膜におけるリン酸緩衝液生理食塩水調整の効果

リン酸緩衝液と同様に、PBS で調整した酸性膜は、低 pH で最初に存在していたポリマー間の強い会合を完全に破壊することなく、膜の pH を高める。従って、PBS 緩衝液を使用して実質的に PBS に入れて調整した場合、最初の膜の pH3.14 が pH6.02 になる。PBS 中で同じ pH を生じる未調整の膜は、最初は 3~4 の範囲の pH を有するだろう。さらに、2 以下の pH の場合を除き、調整された膜は、未調整の膜よりも高率で水和する。このように、調整された膜は、最初の酸性膜のいくつかの特性を保持したまま、溶液中で送達される酸負荷を軽減するため、より生体適合性に優れる。

実施例 10 : 多層化 CMC/PEO 膜 さらに変わった性質の膜を提供するため、中性膜から

なる2つの層の間に酸性化膜を積層することにより膜を製造した。後者は、酸性化膜として同一の CMC/PEO 比であったとしてもそうでなくともよい。まず、部分乾燥した1枚の中性膜を積層膜用の乾燥面として用いる乾燥した平らな面の上に置いた。その中性膜の上に、わずかに小さい面積の部分乾燥した1枚の酸性化膜を慎重に置いた。次に、その酸性化膜の上に、部分乾燥したもう1枚の膜を慎重に置いて、2枚の中性膜の縁を合わせ、酸性化膜の縁が2枚の中性膜の縁を越えることのないようにした。3枚のシートすべてを正確に整列させ、シートが互いにずれないように注意しながら、シャーレに脱イオン水をゆっくり入れた。すべてのシートが湿ったら、その湿った積層シートの上に、ナイロンフィルター媒体のような非吸収性の多孔性の薄膜を慎重に置いて、その上をほんのわずかにプレスした。そして、このアセンブリを乾燥するまで破壊しないようにし、その多孔性膜を慎重に取り除き、平らな面から積層膜を取り除いた。

代わりの2層膜を同様の方法で作った。2層膜は、各面で異なった性質を示す。低 pH の面は生体付着性に乏しく、高 pH の面よりも組織上をすべり易い。高 pH の面は、組織に密着してより強固に付着して組織内の空隙に適合して膜を適所によく保持させる。このような膜は、可動性の組織が、より固定的な組織に対して正常に自由に動くことができるような状況で有用である。

部分乾燥した膜 (CMC : PEO の比率 = 95 : 5、pH3.0、15gm の2%ポリマー溶液から製造) をシャーレに入れ、その部分乾燥した膜の表面上に、CMC/PEO (CMC : PEO の比率 = 95 : 5、pH5.5、10gm の2%ポリマー溶液から製造) 混合物を注ぐことによって、もう一つの2層膜を作った。そして、その混合物と部分乾燥した膜と一緒に乾燥して最終的な2層膜を形成した。同様な方法で、PEO 組成を変えた2層膜、例えば、2層が異なった PEO 含量の膜を作った。層の PEO 含量が高いほど、その層の表面がより滑りやすくなる。他の層、より PEO 含量の低い層は、組織に強固に付着する。

一実施例は腹腔の手術であり、腸膜は、相互に又周囲の腹膜に対して自由に動く。さらに実施例として胸部の手術があり、肺は周囲の腹膜に対して自由に動けなければならない。膜の高 pH 面を壁側腹膜に対して配置すると、適所に膜を保持するが、内臓性腹膜を肺に付着させて自由に動かすことができる。同様に、心臓手術では、心臓に、2層膜の高 pH 面を配置すると、膜を適所に保持し、低 pH 面は心臓の組織、例えば心筋上を自由に滑る。同様に、整形外科手術では、固定組織、例えば骨又は骨膜に、膜の高 pH 面を配置すると、それらの位置に膜をしっかりと付着させ、靱帯、腱、又は筋肉のようなより固定度の低い組織を自由に動かすことができる。

実施例 11 : 鑄造溶液の安定性に及ぼす CMC/PEO 濃度の効果 鑄造溶液の安定性に及ぼす CMC/PEO 濃度の効果を測定するため、16g の CMC $d_{50}=1.2$ 及び 4g の PEO (300kd) を、50ml のイソプロパノールに加えてスラリーを作り、それを 450ml の水に加えた。この結果、かなり均一で実施例 1~10 よりも高粘性の鑄造溶液が生じた。一連の膜は、鑄造溶液を酸性化して漸次的に pH を減じて作った。11g ずつの鑄造溶液を 10cm の

シャーレに注いで乾燥した。

pH が約 3.3 以上で膜は均一であったが、低 pH では鑄造溶液から会合複合体が析出した。膜の pH が低いと、生成する膜は不均一領域及び穴を有し、表面が粗かった。

膜は、10 質量%程度の CMC と、20 質量%程度の溶液から作ることができる。

実施例 12 : CMC/PEO 膜の抗血栓形成効果 CMC (7HF PH) 及び CMC/PEO (500kd) 膜を、80%/20%、65%/35%、及び 50%/50% の CMC/PEO 比で作った。付着性プレート用の観察チャンパーを、1枚のポリマーコートスライドガラスと、2枚のポリエチレンスプレーと、1枚のカバーガラスから組み立てた。インフォーメドコンセント後、健康な大人のボランティアから入手したヒト血液を、ヘパリン含有真空容器 (VacutainersTM, Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) に収集した。ヘパリン化血液を 100g で 10 分間遠心分離にかけ、血小板リッチな血漿 (PRP) を得た。

200 μ l の PRP を血小板観察チャンパーに滴下した。PRP 中の血小板は、室温で1時間でポリマー表面に付着し活性化された。PBS でチャンパーを洗浄して、付着しない血小板及び血漿タンパクを除去した。付着した血小板を PBS 中 1 時間、2.0% (w/v) グルタルアルデヒド溶液で固定化した。PBS による洗浄後、0.1% (w/v) Commaassie ブリリアントブルー (Bio-Rad, Hercules, CA) 染料液によって 1.5 時間で染色した。Nikon LabophotTMIII 光学顕微鏡を使用して、その染色血小板を 40 倍に拡大して観察した (Melville NY)。付着血小板の画像は、Mamamatsu CCDTM カメラ (浜松市、日本) を使用して Sony TrinitronTM ビデオディスプレイに移した。Hamamatsu Argus 10TM 画像プロセッサを使用して、観察したすべての領域について、表面積 25,000 μ m² 毎の血小板の数を数えた。血小板の活性化の程度は、付着血小板の拡散の仕方から定性的に決定した。活性化血小板の画像は、Polaroid ScreenShooterTM カメラ (Cambridge, MA) を使用して Sony TrinitronTM ビデオディスプレイ画面から得た。

付着血小板の数及び血小板の活性化の程度は、血液含有医用材料の血栓形成性の初期的な指標と考えられる。血小板の活性化は、ポリマー表面に対する血小板の拡散の範囲によって定性的に決定した。血小板の拡散の範囲は、表 10 に示されるように、1 (最低の反応性) から 5 (最高の反応性) で判定した。

表 10 血小板の活性化の評価 : 面誘導拡散

表 11 CMC/PEO 膜による血小板の付着性及び活性化

表 11 は、100%CMC 製の膜上に有意な数の血小板が付着し活性化されたことを示す。平均的には、25,000 μ m² 毎に 95 以上の活性化血小板が存在した。付着血小板の数及び活性化の程度は、膜の PEO 含量を増やすと減少した。CMC/PEO 50%/50% 膜は、最も血小板の数が少なかった。平均的には、たった 5.0 個の接触-付着血小板しかこれらの膜上には存在しなかった。

この研究の結果は、付着血小板の数及びこれらの表面上における血小板の活性化度の減少

に基づき、CMC/PEO 膜、特に 50%/50% CMC/PEO 膜は、抗血栓形成性が高いことを示している。このように、膜の PEO 含量を増やすと、抗血栓形成性が高まる。

CMC 及び PEO が生体内の血液凝固に副作用を及ぼすかどうかを測定するため、ウサギに CMC/PEO 混合物を注射してプロトロンビン時間を測定する一連の研究を行った。

4 匹のウサギ(2.4~2.8kg)を、ケタミン(40mg/kg)及びキシラジン(8mg/kg)で麻酔し、0.20ml の臨床グレード 2% CMC、0.05% PEO、50% の水及び 47.9% の平衡塩類溶液 (ロット #SD011089) を、27-ゲージの 1/2 インチ針を用いて低背髄性領域に注入した。5 番目の注射しないウサギ (2.8kg) を対照として使用した。投与後 0 (注入前)、2、6、24、48、及び 96 時間に、血液の試料 (約 1.6ml) を採取した。収集した血液 1.6ml に、0.2ml の 3.8% ケン酸ナトリウム溶液を添加した。混合後、その試料を 2000rpm で 3~5 分間臨床用遠心分離器で遠心分離して、血漿を調製した。血漿をピペットで個々にラベルした試験管に入れて氷上に放置した。その試料を凍結させ、California Veterinary Diagnostics, Inc., West Sacramento, CA に送り、プロトロンビン時間の測定を、FDA の優良実験室規範に従って行なった。

表 12 は、種々の採取時間におけるウサギの血漿についての各試料のプロトロンビン時間を示す。ウサギの血液は、ヒトの血液よりも早く凝固する (Didisheim ら、J.Lab.Chn.Med.53,866-1959)；従って、これらのウサギから収集した試料のいくつかは、分析前に凝固した。しかし、分析した試料は、ウサギ番号 3 が過渡的な増加を示したが、4 日までに回復したのを除き、プロトロンビン時間については CMC/PEO 混合物の影響は示されなかった。

表 12 CMC/PEO を注射したウサギのプロトロンビン時間 (秒)
ウサギ番号

実施例 13: CMC/PEO 膜の生体付着性の測定 膜の生体付着性は、一般的に、以下に述べる剥離試験で測定した。CMC(7HFPF)及び PEO (分子量 5000kd) から構成され、酸性度を変化させた数種の膜を、インビトロ試験で相対的な生体付着性を調べて決定した。膜の接着体としてローカルストアで購入した新鮮な、芯抜きポークチョップを使用した。6 個の薄くカットしたポークチョップをポリスチレンのバイオアッセイ皿 (243×243×18mm) に入れ、その皿にいくらかの水を入れて比較的高温のある環境を維持した。ポークチョップの露出面から如何なる過剰な水も吸い取るように注意した。6 種の膜を質量 120-130mg の長方形の形態にカットし、膜の滑らかな面を下にして、6 片それぞれ肉の上に置いた。膜の滑らかな面は、乾燥工程でポリスチレンの表面に付着された面である。空気に露出された、膜のもう一方の面は、通常わずかに粗い面になる。ポリスチレンの上蓋を皿の上に置き、室温で 3 時間、膜を水とさせて肉に付着させた。同様な方法で、他のバイオアッセイ皿を使用して他の膜を調べた。

3 時間のインキュベーション後、透明性(色、透明度)、膜の構造特性、膜の形態(肉上での

折れ曲がり)、分岐、強い生体癒着の結果としての液状について、定性的方法で、膜と肉を慎重に検査した。gm. での癒着力は、まずクリップを膜の縁に取り付け、次にそのクリップをばね秤 (0-10gm 又は 0-250gm の範囲) に取り付け、そのばね秤を垂直に上昇させて肉から膜をゆっくり引き離すことによる剥離試験で定量的に測定した。膜を肉から完全に引き離す、或いは場合によっては膜を引き裂くのに必要な、gm. での力を記録した。

表 13 まとめ: CMC/PEO 膜の付着力の比較 膜の PEO (5000kd) の%

表 13 で示される結果から、CMC/PEO 膜間の癒着力は膜の pH に関係することがわかる。特定の PEO 百分率について最も高い癒着性を示す pH は、約 3.30 であったが、このレベルから pH が増加しても減少しても癒着力は減少した。さらに、癒着力は、膜の %PEO に関係した。PEO 百分率が最高の膜は、最も癒着性が低かった。PEO 百分率が高くなると、5% PEO に達するまでは癒着性が増加したが、さらに PEO 濃度を高めると、癒着力は減少した。

実施例 14: CMC 及び PEO の生体内クリアランス CMC 及び PEO の生体内クリアランスを測定するため、放射標識した CMC 及び PEO (2% CMC) 0.05% PEO、50% H₂O 及び 47.9% 平衡塩類溶液) でラットに注射する一連の実験を行った。試験は、優良実験室規範で行った。

[¹⁴C]カルボキシメチルセルロース (CMC) 及び [¹⁴C]ポリエチレンオキサライド (PEO) を含有する配合剤を、6 匹のラット (3 匹のオス、3 匹のメス) の 4 グループの低背髄性領域に注射した；2 グループは 3 日後に犠牲にし、残りの 2 グループは 7 日後に犠牲にした。これらのラットから毎日尿及び糞を収集して放射能の排泄傾向を検査した。さらに、これらのラットに残された放射能レベルについて、代表的な臓器を調べた。6 匹のラットの別々の 2 セットに同様に注射して、血液の試料を、注射後、0 時間(注射前)、8、24、48、72、96、及び 168 時間における放射能を調べた。

両化合物は、主に尿中に排泄された。尿中のほとんどの排泄は、最初の 24 時間で起こった。7 日試験では、尿及び糞中の ¹⁴C-CMC 排泄の半減時間は、最初約 0.2 日(5 時間)、次いで約 1.6 日の長い排泄半減時間であった。対応する ¹⁴C-PEO についての値は、それぞれ 0.2 日 (5 時間) 及び 1.7 日であった。臓器試験については、肝臓及び腎臓が最高レベルの放射能を含んでいた。肝臓の注入投与量の割合は、¹⁴C-CMC と ¹⁴C-PEO で同様であったが、腎臓では、¹⁴C-PEO の注射後が、¹⁴C-CMC の注射後の少なくとも 6 倍高かった。

¹⁴C-CMC 投与後の血中の放射能レベルは、約 1 日の半減時間で減少したが、¹⁴C-PEO の血中半減時間は、約 4 日であった。注射部位を加えた死骸に残された投与量の割合は、¹⁴C-PEO についてよりも ¹⁴C-CMC についてが高かった。投与量の全体の回復の平均は、両化合物について 80+% であった。¹⁴C-CMC 又は ¹⁴C-PEO の注射により何の副作用も観察されなかった。

実施例 15: CMC/PEO 膜の生体吸収性 CMC/PEO 膜の生体吸収性は、ラットの後ろ足

に外科的切開を施し、筋肉層に1片の CMC/PEO 膜を置くことによって測定した。組成又は架橋度の異なる数種の膜を各動物に挿入し、その後切り口を閉じる。各タイプの膜について十分な数の動物を使用して評価する。その後、毎日動物を犠牲にし、切り口を再び開き、残存膜の無傷の程度、及びその場所について調べた。膜を取り除き、過剰の水を吸い取って除去し、ウェット状態で秤量し、再乾燥して再秤量した。吸収された液体量、残っている固体量、及び膜の外観を記録する。生体内原位置での時間の長さ、組織の場所、膜の組成、挿入前調整、及び吸収性について比較する。本発明の膜は、生体吸収性を所望の程度に合わせて作る。

実施例 16: CMC/PEO 膜の抗癒着特性の測定 癒着形成を阻止する CMC/PEO 膜の能力は、Harhs ら、Surgery 117(6):663-669、(1995)の標準法に従って測定する。成熟ラットを使用する。ラットを深い知覚麻痺が達成するまで、腹腔内用ペントバルビタールナトリウム (43mg/kg)

で麻酔し、手足の挟持に対する痛み応答及び腹壁反射なしで測定する。ラットの腹側を上にして置き、腹腔の毛を除去し、ヨードフォア腫きで皮膚を清浄し、70%アルコールですすいだ。

無菌状態の下、6cm 長さの腹部正中線切開をして皮膚を収縮させる。腹腔内に 4cm 長さの正中線切開をし、右の腹腔壁を反射させる。その正中線切り口の 1 cm 外側の内性筋肉の浅板を含め、1×2 cm の壁側腹膜を切除する。そして、盲腸が縫合で腹腔壁に接触するように、盲腸を上昇させる。盲腸いくつかの領域を無菌の外科用メスで軽く擦過して点状出血の均一面を作る。また、反応した腹腔壁を擦過して、擦過領域を 10 分間空気にさらす。

盲腸の並べる部分及び腹腔壁を相互に接触させて配置し、或いはそれらの間に配置される標準量の抗癒着膜と共に相互に並べる。擦過領域を覆った後、切り口を閉じる。3 日から 4 週間後、その動物を過剰の麻酔薬で犠牲にして、手術部位を露出する。

癒着は、Becker ら、J.Amer.Coll.Surgeons 183(4): 297-306(1996)に従い、0~3 で評価し、0 は癒着が検出されない場合、1 は薄膜の厚み、無血管性であり、グレード 2 は適度な厚みで限界的な血管分布を有し、グレード 3 は濃厚な厚みを有しかつよく血管新生化されている場合である。癒着性を評価する他の方法を用いてもよい。(E.g.,Diamond,Fertility and Sterility 66(6): 904-910(1996); Interceed (TC7) Adhesion Study Group,Fertility and Sterility 51(6): 933(1989)).

膜の生体吸収性は、犠牲にしたときに手術部位を触診し、また無傷の膜があるか或いは無いかを判定して決定する。無傷の膜が存在する場合は、それを部位から取り除き、ウェット質量及びドライ質量を測定する。本発明の膜は、所望の抗癒着特性を示すように合わせて作られる。

手術のタイプ 本発明の膜の使用によって、外科的手法のいずれのタイプも利益を得る。

以下に例示するが、限定するものではない。

実施例 17: 頭蓋手術 開頭術用途のため、本発明の膜は、頭蓋骨穿孔及び頭蓋切除後の硬膜置換移植片として使用される。膜を露出した皮質上に置く。骨、軟部組織及び頭皮を交換して手術を完成する。膜は頭皮と頭蓋骨の間の癒着形成に対するバリア及び頭蓋の回復に必要な初期内圧に効果を及ぼす骨組みを形成する。

実施例 18: 眼球手術 眼球用途は緑内障のフィタリングの手術を含む。成功した緑内障のフィタリング手術は、前眼房から外科手術的に作られた薬管を経て水性体液が結膜下腔に通過し、その結果フィタリング小疱の形成を生じるということで特徴づけられる。

小疱形成の失敗は、ほとんど線維芽細胞の増殖及び結膜下線維症に原因がある。この線維症を防止するため、手術後に小疱内の結膜下腔に本発明の膜を配置することができ、膜を線維芽細胞内に配置することもできる。

実施例 19: 筋骨格の手術 腱の屈折の修復は、本発明の膜を使用することによって強化することができる。腱の修復では、線維芽細胞によって分泌されるコラーゲンが腱の末端を結合させる。癒着形成は、通常、腱を他の組織構造に結合させ、腱と腱鞘の間の正常なベースを閉鎖し、それによって滑らかな動きに必要な滑機能を妨害する。腱と腱鞘の間の癒着形成を防止するため、再結合される縫合腱の端部の周囲を本発明の膜で包み、及び/又は本発明のハイドロゲル形態をその外筒内に注入する。

腰部の椎弓切除及び椎間板切除術のため、棘状突起の球状先端部のちようど外側の腰背筋膜に正中線切開を施す。その傍線状の筋膜を開いて患部の椎間板の層間領域を露出する。椎弓切除は、開かれた黄色筋帯を露出し、硬膜を露出して行う。硬膜を中程度に収縮させて神経根を確認して収縮させる。椎間板領域を露出して神経フックで検査する。その環のデクスチャャー、その環内の膨隆量、ヘルニアの存在又は穴の存在を調べる。椎間板の除去は、通常、環内の小さい穴を通して行う。手術後の癒着は、手術の最後に閉じる前に、本発明のハイドロゲル形態を、環、神経根、硬膜及び椎弓切除欠失の周りのススペースに注入することによって防ぐ。

実施例 20: 腹部手術 従来の開腹術患者の 93%までに、手術後の癒着が報告されている。開腹術は、大腸及び小腸の処置、胃、食量、及び十二指腸の処置、胆嚢摘出術及び女性の生殖系に関する手術のため、腹部へのアクセスを増やす必要がある。1992 年に健康統計学センターが、米国における腹膜癒着溶解に関する 344,000 の手術について報告した。腹膜癒着は、解剖学的に腹部臓器を歪ませると病理的になり、腸捻転及び腸閉塞から不妊症に及ぶ種々の罹患を引き起こす。不幸なことに、癒着の手術分裂後の癒着の再形成及び再発は、かなり一般的である。

新生の癒着形成又は癒着の再形成を防止するため、手術部位上に本発明の膜を直接配置し、又はその部位の周囲を本発明の膜で包んで、この部位を網 (omentum) から引き離す。閉じるときは、正中線切り口の下の筋膜と腹膜間に、本発明の膜を配置する。腹腔鏡検査法では、本発明のハイドロゲル形態を用いて手術部位及び套管針挿入領域を被覆する。

実施例 21: 婦人科の手術: 開腹術又は腹腔鏡検査による筋腫摘出術 子宮を露出し、切開

して線維腫を除去する。吸収性縫合糸で子宮を閉じる。後側子宮切開は、底部又は前側子宮切開よりも多くなつ程度の高い付属器癒着を付随する。後側切開のため、後側子宮切開の上及び前側腹部壁切り口の下に本発明の膜を施して、子宮と周りの組織間の癒着形成を防止する。前側切り口は、さらに一般的に膀胱と子宮の前側壁との間の癒着形成を生じさせる。本発明の膜を、前側切り口の上及び子宮と膀胱との間に配置させる。

実施例 22：胸部手術：心臓の処置 再手術による心臓の外科的処置はより一般的になり、手術後の縦隔癒着及び心臓癒着の軽減又は防止が必要になっている。胸骨正中切開は、正中線心臓切開に先行する。心臓は浮遊しているので、心臓及び心臓腔は広く露出されている。切開を行う。バイパスを作るため、末端の吻合を内乳動脈、桡骨動脈、胃大網動脈又は伏在静脈移植片を用いて作製する。癒着形成を防ぐため、その吻合の周囲を本発明の膜で包み、閉じる前に心臓と胸骨間に本発明の膜を配置する。

本発明の他の特徴、観点及び目的は、図及び請求の範囲のレビューから得ることができる。すべての引用は、その全体が本明細書に参照文献として取り込まれている。

本発明の他の実施態様は発展させることができ、かつ本発明の精神と範囲及び請求の範囲内であると理解すべきである。